

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Alergická senzitivace a potravinová alergie
(orální alergický syndrom)**

**Allergic sensitisation and food allergy
(oral allergic syndrom)**

Vedoucí diplomové práce: prim. MUDr. Irena Krčmová, CSc.

Hradec Králové, 2012

Michaela Kmoníčková

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum:

Podpis:

Mé poděkování patří prim. MUDr. Ireně Krčmové, CSc. z Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové za odborné vedení, pomoc při vypracování diplomové práce, zajištění finančního sponzora k projektu této diplomové práce, věnovaný čas a poskytnuté materiály. Dále děkuji kolektivu lékařů ÚKIA Fakultní nemocnice Hradec Králové za výběr pacientů a sběr krevních vzorků a Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Plzni za možnost měření, zejména Bc. Tomáši Vlasovi za odborné rady a pomoc při měření.

OBSAH

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
1. ÚVOD.....	5
2. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1 Alergická senzibilizace.....	11
3.2 Přecitlivělost na potraviny.....	11
3.2.1 Potravinová alergie.....	12
3.2.1.1 Reakce I. typu.....	12
3.2.1.2 Mastocyty.....	14
3.2.1.3 Imunoglobulin E.....	14
3.2.1.4 Receptory pro Fc fragment.....	15
3.2.1.4.1 Vysokoafinní receptory FcεRI.....	15
3.2.1.4.2 Nízkoafinní receptory FcεRII.....	15
3.2.1.4.3 Galektin-3.....	15
3.2.1.5 Aktivace žrných buněk.....	16
3.2.2 Orální alergický syndrom.....	17
3.2.2.1 Zkřížená reaktivita.....	17
3.2.3 Alergeny.....	18
3.2.3.1 Panalergeny.....	19
3.2.3.1.1 PR-10 protein.....	19
3.2.3.1.2 Profiliny.....	19
3.2.3.1.3 Protein LTP.....	19
3.2.3.2 Alergenicit.....	20
3.3 Laboratorní diagnostika potravinové alergie.....	20
3.3.1 Technologie mikropolí.....	20
3.3.1.1 Technologie ImunnoCAP® ISAC.....	21
3.3.1.1.1 Charakteristika biočipu.....	21
3.3.1.1.2 Princip stanovení.....	22
3.3.1.1.3 Vyhodnocení měření.....	22
3.3.1.1.4 Rekombinantní alergen.....	22
3.3.1.1.5 Alergenový panel.....	22
3.3.1.1.6 Výhody metody.....	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4.1 Charakteristika souboru.....	25
4.2 Pojmy.....	25
4.2.1 Fluorescence.....	25
4.2.2 Specifické IgE.....	25
4.3 Princip metody.....	25
4.4 Vzorky.....	26
4.5 Přístroje.....	26
4.6 Reagenční aparát.....	26
4.7 Pomůcky.....	26
4.8 Postup přípravy skel.....	27
4.9 Analýza skel.....	28
4.10 Testované alergenové složky.....	28

4.11 Metody statistického zpracování výsledků	32
4.11.1 Kontingenční tabulka	32
4.11.2 Pearson Chí-kvadrát	32
4.11.3 Spearmannův korelační koeficient	33
5. VÝSLEDKY	34
5.1 Výsledky měření	35
Tab.1: Výsledky měření potravinových alergenů	35
Tab.2: Výsledky měření pylových alergenů	39
Tab.3: Výsledky anamnézy	43
5.2 Statistické zpracování	45
5.2.1 Kontingenční tabulky	45
5.2.2 Vyhodnocení	51
6. DISKUZE	53
7. ZÁVĚR	55
8. LITERATURA	57
SEZNAM ZKRATEK	60

ABSTRAKT

Kmoníčková M.: Alergická sensitizace a potravinová alergie (orální alergický syndrom). Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd, Hradec Králové, 2012, 56 s.

Potravinová alergie je jedním z nejrozšířenějších alergických onemocnění. V dospělé populaci je její nejčastější formou orální alergický syndrom, který vzniká na základě zkřížené reaktivity mezi pylovými alergeny a potravinovými alergeny rostlinného původu. Nyní označován jako pylově-potravinový syndrom.

V rámci této diplomové práce bylo laboratorně vyšetřeno 40 pacientů na pozitivitu sIgE metodou ISAC. Výsledky měření byly hodnoceny ve vztahu k uváděným klinickým projevům s cílem stanovit vztah mezi pozitivitou sIgE a pravděpodobností výskytu klinických projevů. Nejčastější byl výskyt klinických projevů po jablku u pacientů s pylovou alergií Bet v 1 a Aln g 1. Tento vztah mezi pozitivitou sIgE a pozitivními klinickými projevy je velice těsný a z pohledu diagnostiky přínosný. Ve vztahu mezi klinickými projevy po lískovém ořechu a pozitivitou sIgE je pravděpodobnost náhody již okolo 7% a v případě klinických projevů po broskvi je to více než 50%. V případě testování broskve jsme se setkali s množstvím falešně pozitivních výsledků, které vznikají na základě zkřížené reaktivity. Široce screeningové testy jako ISAC detekují sIgE proti rozsáhlému spektru alergenových složek, ale nedokáží rozlišit klinicky významnou pozitivitu sIgE od klinicky nevýznamné.

Klíčová slova: zkřížená reaktivita, orální alergický syndrom, pylově-potravinový syndrom, technologie microarray

ABSTRACT

Kmoníčková M.: Allergic sensitisation and food allergy (oral allergic syndrome). Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Biological and Medical Science, Hradec Králové 2012, 56 p.

Food allergy is one of the most spread allergic diseases. Oral allergic syndrome is the most common form of food allergy occurred at adult population which stems from a cross-reactivity between pollen allergens and food allergens of vegetable origin. Nowadays it is known as pollen-food syndrome.

There has been laboratory tested 40 patients positive for sIgE by ISAC as a part of this thesis. Results were evaluated in relation to clinical manifestations reported in order to establish a positive relationship between the sIgE and probability of occurrence of clinical manifestation. The most frequent incidence of clinical symptoms have been founded after eating apple in patients with pollen allergy Bet v 1 and Aln g 1. This positive relationship between sIgE and clinical positive manifestations are very tight and in terms if diagnostic benefit. The probability of chance of clinical manifestation at patients who were eating hazelnuts and positive sIgE is 7% and at patients who were eating peaches is the probability of chance of clinical manifestation more than 50%. In the case of peaches testing there were a lot of false positive results that arise from cross-reactivity. Widely screening tests as ISAC detect sIgE in extensive range of allergenic elements, but fail distinguish clinically significant positivity of sIgE from clinically insignificant one.

Key words: cross-reactivity, oral allergic syndrome, pollen-food syndrome, microarray technology

1.ÚVOD

V současné době můžeme pozorovat nárůst počtu alergiků a to nejen v naší populaci, ale také v celosvětovém měřítku. Odhaduje se, že v průmyslově vyspělých státech se počet postižených osob ročně zvyšuje o 5% [1]. Na nebývalém vzestupu alergických onemocnění se jistě podílí mnoho faktorů, které souvisejí s rozvojem současné společnosti. Mezi ně patří nezdravý životní styl (špatná výživa, kouření, nedostatek pohybu, stres, nepřiměřené hygienické nároky), úroveň životního prostředí (zvýšená koncentrace obyvatel ve městech, život v uzavřených interiérech, zplodiny průmyslu, UV záření), která je zdrojem mnoha alergizujících látek. V neposlední řadě je to také rozvíjející se cestovní ruch. Tyto vnější faktory mohou alergii samy vyvolat nebo působí jako induktory (spouštěče) alergických onemocnění. Vedle těchto zevních vlivů je třeba brát v úvahu také genetickou predispozici. Klinický projev alergie chápeme jako výsledek interakce genů a činitelů prostředí na podkladu geneticky podmíněné imunoregulační poruchy. Jedná se o polygenní onemocnění, v posledních letech jsou studovány epigenetické faktory.

V zemích západního světa patří k nejčastějším alergickým onemocněním potravinové alergie. Postiženo je asi 6-8% dětí a 2-3% dospělých. Prevalence onemocnění je dále vyšší u pacientů s atopickou dermatitidou, kde klinicky relevantní potravinovou alergií trpí asi třetina dětí [2,3]. Rozdíl výskytu mezi dětskou a dospělou populací je dán nezralostí imunitního systému dětského organismu. Podíl zde mají i změny v názorech na stravovací návyky dětí. Zvláštností je, že prevalence alergií se celosvětově v drtivé většině studií shoduje. Geografické a klimatické podmínky spolu s národními kuchařskými specifiky jednotlivých zemí světa tedy nemají vliv na výskyt alergie, ale jednoznačně ovlivňují výskyt nejsilnějšího alergenu v dané oblasti. [4]

K nárůstu počtu alergií, nejen potravinových, rovněž přispívají nové poznatky v oblasti diagnostických metod v oboru imunologie a alergologie. Alergologické vyšetření se skládá z několika částí: z anamnézy (osobní, rodinné i pracovní), fyzikálního vyšetření, alergenových testů (kožní, provokační) a laboratorních vyšetření. Diagnostický postup potravinové alergie se zaměřuje na prick testy (kožní bodové testy), stanovení specifických IgE protilátek v séru, dietu založenou na eliminaci alergizujících potravin a orální expoziční testy. U většiny pacientů jsou standardem v diagnostice potravinových alergií orální provokační testy a prick testy. U pacientů, u kterých kožní test nebyl jednoznačný nebo jej lze provést obtížně či

vůbec např. u malých dětí, a dále u pacientů s vysokým rizikem anafylaxe po orálním provokačním testu, mají velký význam in vitro testy, zejména měření specifického IgE v séru. Pozitivita těchto protilátek v séru podporuje diagnózu a dobře koreluje s konvenčními testy. Jako screening může být taktéž doporučen labiální provokační test.

Novou metodou ve stanovení hladiny specifických IgE protilátek je technologie velkokapacitních mikropolí (microarray). Princip spočívá v uchycení velkého množství rekombinantních alergenů na proteinové mikropole, což nám umožňuje během jednoho vyšetření z malého množství séra stanovit specifické IgE proti mnoha molekulám najednou. Díky velkému počtu testovaných alergenů se snadněji stanovuje profil senzibilizace pacienta a napomáhá odhalování zkřížené reaktivity, což vede ke zpřesnění diagnostiky. První metodou proteinových polí použitou pro stanovení specifických IgE protilátek je prototyp ISAC, vyrobený společností Phadia, a nyní ve své aktuální verzi z ledna 2012 obsahuje 112 alergenových složek.

Jako u většiny nových technologií je také u ISACU nevýhodou finanční náročnost. Vzhledem k rozšiřujícímu se spektru alergenů, jak ve smyslu objevování nových alergenů, tak v rozpoznávání specifických složek již známých alergenů, má do budoucnosti metoda mikropolí významné místo v diagnostice potravinových alergií. [5]

Předmětem této práce je příprava vzorků sér, měření specifického IgE metodou ImunnoCAP ISAC (Phadia) a porovnání výsledků s osobní anamnézou v souboru 40 pacientů se subjektivně udávanými projevy pylově asociované potravinové alergie.

2. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE

Cíl diplomové práce:

Na základě osobní anamnézy a výsledků laboratorního vyšetření metodou ImunnoCAP-ISAC (Phadia) stanovit vztah mezi laboratorní hodnotou specifického IgE a udávanými klinickými projevy potravinové alergie, který by měl význam v predikci výskytu klinických projevů v závislosti na hladině specifického IgE. Hodnocení výsledků je zaměřeno na zkříženou reaktivitu rostlinných potravin s pylovou asociací.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alergická senzibilizace

Alergickou senzibilizaci lze charakterizovat jako proces získání zvýšené schopnosti organismu reagovat na určitý podnět, jehož následkem je nefyziologická reaktivita, nejčastěji alergie. Alergie, též označovaná jako hypersenzitivita, přecitlivělost, představuje zvýšenou citlivost imunitního systému vůči tělu cizím látkám tzv. antigenům. Antigeny, které jsou spouštěči těchto nepřiměřených a nežádoucích reakcí, označujeme jako alergeny. Po vstupu do organismu je alergen rozpoznán imunitním systémem a dochází k rozvoji alergie na základě imunopatologických reakcí. [1,6]

Jak již bylo v úvodu zmíněno, na rozvoji alergického onemocnění se podílejí jednak faktory vnějšího prostředí a dále faktory vnitřní, zejména genetické. Geneticky podmíněnou náchyllost (dispozici) dnes označujeme jako atopii, každého člověka s genetickou predispozicí k tvorbě alergických protilátek označujeme jako atopika. Jak atopie tak i alergie jsou tzv. polygenně podmíněné. To znamená, že tato predispozice není vázána na jeden určitý gen, ale že se na laboratorní charakteristice a klinické symptomalogii podílí skupina genů. Některé geny, tzv. spící geny, jsou aktivovány v závislosti na vlivech prostředí. [1,6]

3.2 Přecitlivělost na potraviny

Jako přecitlivělost na potraviny můžeme označit jakoukoli nežádoucí reakci na potraviny. Velmi často se termín potravinová přecitlivělost volně a nesprávně nazývá potravinová alergie, i když v mnoha případech se o alergii v pravém slova smyslu nejedná. Nepříznivé, v některých případech až škodlivé reakce na potraviny lze rozdělit na toxické a netoxické. Toxické představují skupinu reakcí vyvolaných působením jedů nebo toxinů např. endotoxinů hub, bakterií či plísní, které se mohou v potravinách vyskytnout a jejichž působením dochází k intoxikaci organismu. [1]

Oproti tomu mezi netoxické reakce patří potravinové alergie založené na imunopatologickém základu. Řadí se mezi ně IgE dependentní (IgE závislé)

alergie, které jsou spojené se zvýšenou hladinou specifických imunoglobulinů třídy E, označují se také jako IgE mediované nebo alergie non-dependentní, bez přímého vztahu k IgE. Je třeba zmínit, že imunopatologická reakce zprostředkovaná protilátkami IgE nastává po expozici alergenu geneticky predisponovaných osob, u normálních osob následuje po expozici alergenu fyziologická imunitní odpověď, např. tvorba specifických protilátek třídy IgG. [7]

Jako druhý typ netoxických reakcí můžeme označit nealergickou přecitlivělost na potraviny, v tomto případě se jedná o potravinovou intoleranci (nesnášenlivost), které se imunitní systém neúčastní. V souvislosti s nežádoucími reakcemi na potraviny je zmíním potravinovou averzi, označovanou také jako psychogenní averze či intolerance. Zde je příčina psychosomatického charakteru a psychika je ovlivňována negativním společenským postojem nebo mediální prezentací vůči určitému typu potravin. O neopomenutelnosti psychické stránky při diagnostice svědčí data dotazníkových studií, o potravinové alergii je přesvědčeno až 20% populace. [6]

3.2.1 Potravinová alergie

Potravinová alergie je nežádoucí, nepřiměřená reakce na přijatou potravu, zprostředkovaná specifickým imunopatologickým mechanismem.

Podle nejnovějších poznatků se na procesu potravinové alergie podílí řada imunologických příčin, intenzivně se studují všechny typy imunopatologických reakcí, kde by mohl být nalezen další etiologický potenciál vzniku potravinových alergií. Klinicky i diagnosticky je nesrozumitelnější alergie I. typu [4], většina alergických onemocnění je jí svou patogenezi blízká.

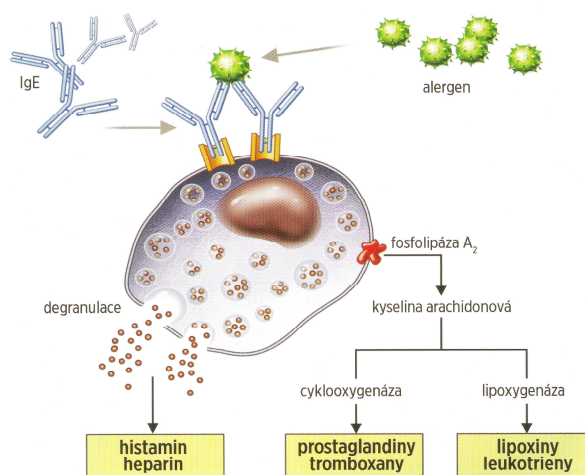
3.2.1.1 Reakce I. typu

Tento typ přecitlivělosti, rovněž označovaný jako anafylaktická nebo časná reakce, je charakterizován tvorbou protilátek třídy IgE. Přestože není IgE primárním a jediným faktorem této reakce, považujeme ho za typický. Po primární expozici, tj. prvním setkání s alergenem, dochází ke stimulaci diferenciaci buněk z neaktivních prekurzorů a ke zvýšení syntézy IgE, který se váže na povrchu žírných buněk

(mastocytů). Tím dochází k sensibilizaci organismu. Při dalším kontaktu dojde k aktivaci, kdy se alergen naváže na IgE na povrchu žírných buněk a dojde k uvolnění mediátorů ze zásobních granúl (histamin, heparin) a k tvorbě nových mediátorů (prostaglandinů, leukotrienů, PAF), které mají za následek rozvoj místních nebo celkových příznaků. [4,6]

Zásadní pro rozvoj alergické reakce je rovnováha Th1 a Th2 lymfocytů, jejíž optimální regulace zajišťuje fyziologickou aktivitu imunitního systému. Tvorba alergen-specifických IgE je součástí komplexní abnormální aktivity, která je určována aktivitou Th2 lymfocytů, jejichž aktivita je v případě atopiků nepřiměřená a vede k alergickému zánětu. U atopiků se v průběhu prezentace antigenu naivní lymfocyty Th0 diferencují pod vlivem alergenu a přítomných cytokinů, zejména IL-4, na Th2 lymfocyty. Následně dochází k nahromadění Th2 v příslušné tkáni, kde jsou zodpovědné za rozvoj alergického zánětu. Nejdůležitější funkcí Th2 lymfocytů v této fázi je produkce IL-4, který stimuluje tvorbu protilátek IgE lymfocyty B. [7]

Hlavním místem manifestace tohoto typu reakce je trávicí ústrojí (alergie na potraviny), kůže (kopřivka a atopické dermatitidy), respirační systém s rozvojem bronchospazmu, při progresi stavu anafylaktický šok [8].



Obr.1: Schéma reakce I. typu. Dětská alergologie, Vít Petrů a kol. [6], str.44.

3.2.1.2 Mastocyty

Mastocyty nebo-li žírné buňky jsou charakteristické obsahem typických granul, ve kterých se nachází velké množství biologicky aktivních látek, např. histamin, látek s významným prozánětlivým potenciálem. Hlavním úkolem mastocytů je uvolnění těchto mediátorů zánětu z granul po expozici antigenu. Díky degranulaci dochází lokálně, v místě kontaktu s antigenem, k rozvoji obranné zánětlivé reakci.

Vznikají diferenciací z pluripotentních CD34+ kmenových buněk kostní dřeně pod vlivem CSF (colony- stimulating factor). Zralé mastocyty necirkulují v krvi, ale v organismu jsou lokalizovány na strategických místech, kde je vysoká pravděpodobnost expozice vnějších podnětů, tj. sliznice, kůže, podél cévního řečiště, a jsou schopny velice rychle reagovat. Cílová tkáň ovlivňuje expresi granulačních proteáz a tím další diferenciaci žírných buněk. Mastocyty obsahující tryptázu a chymázu jsou přítomny v kůži, lymfatických uzlinách a nosní a střevní submukóze (tzv. mastocyty pojivové tkáně). Mastocyty obsahující pouze chymázu jsou přítomny tamtéž, zejména ve střevní submukóze. Charakter a množství mastocytů v dané tkáni je určován lokálními podmínkami a zejména lokálním působením cytokinů. [7]

Mají významnou úlohu v regulaci imunitní odpovědi a v komunikaci nervového a imunitního systému, dále zabezpečují fyziologickou funkci sliznic a metabolismu pojivových tkání. V klinické praxi se více než na fyziologický význam mastocytů zaměřujeme na jejich úlohu v některých patofyziologických reakcích, zejména alergie.

3.2.1.3 Imunoglobulin E

Imunoglobulin E (IgE) je produkován lymfocyty B a jeho základní struktura je stejná jako u ostatních izotopů imunoglobulinů. Přesmyk k tvorbě IgE zajišťují cytokiny IL-4 a IL-13, produkované Th2 lymfocyty. Molekula IgE je tvořena dvěma těžkými řetězci ϵ a dvěma lehkými řetězci κ nebo λ . [4,7]

Alergen specifické IgE, které hraje hlavní roli v bezprostřední alergické reakci, působí prostřednictvím vazby na receptory pro Fc fragment.

3.2.1.4 Receptory pro Fc fragment

Receptory pro Fc fragment jsou specifické receptory zprostředkovávající vazbu s Fc částí molekuly IgE. Jsou lokalizovány na různých buněčných typech, především na buňkách imunitního systému, a rozlišujeme tři druhy těchto receptorů. Patří sem vysokoafinní receptory FcεRI, nízkoafinní receptory FcεRII a galektin-3.

3.2.1.4.1 Vysokoafinní receptory FcεRI

Vysokoafinní receptor se skládá z několika podjednotek, u člověka je tvořen řetězcem α , řetězcem β a homodimerem řetězců γ . „IgE reaguje s vysokou afinitou s α řetězcem prostřednictvím domény CH3“. Řetězec β a řetězce γ jsou nezbytné pro přenos signálu do buňky. Receptor FcεRI je ve vysoké hustotě prezentován především na mastocytech, basofilech, Langerhansových buňkách a folikulárních dendritických buňkách. [7]

3.2.1.4.2 Nízkoafinní receptory FcεRII

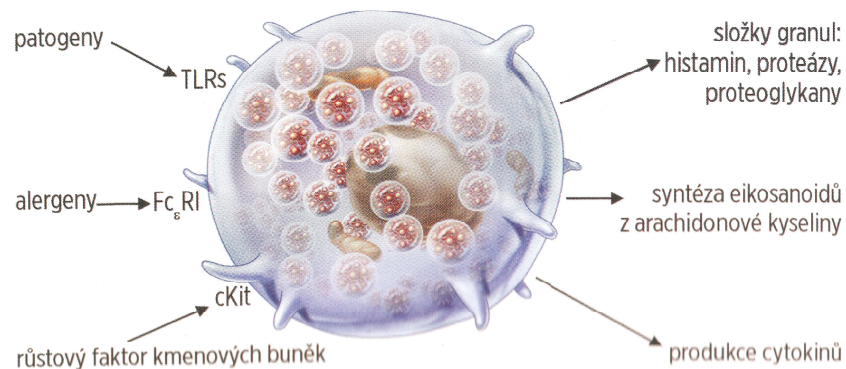
Nízkoafinní receptor FcεRII je zařazen jako molekula CD23, jedná se o transmembránový protein II. typu, který váže především „multimerní komplexy molekul IgE také přes doménu CH3.“ Nachází se v B lymfocytech, NK buňkách, makrofázích, dendritických buňkách, eosinofilech, trombocytech a aktivovaných epitelových buňkách, kde jsou buňky jejich prostřednictvím stimulovány k aktivaci, např. k tvorbě leukotrienů, prostaglandinů, prozánětlivých cytokinů. [7]

3.2.1.4.3 Galektin-3

Třetím typem receptoru pro Fc fragment IgE je galektin-3, který s IgE reaguje prostřednictvím vazby cukerného galaktózového zbytku. Je prezentován na mastocytech, makrofázích, neutrofilních a eosinofilních graulocytech a epitelových buňkách. [7]

3.2.1.5 Aktivace žírných buněk

Klasická aktivace žírných buněk probíhá přes vysokoafinní receptor pro IgE, kdy se na FcεRI receptory váží volné molekuly IgE, které nevytvořily komplex s antigenem. Pokud jsou dva sousední receptory nesoucí IgE přemostěny antigenem, dojde k fosforylaci tyrosinu β- a γ-řetězců těchto řetězců, která aktivuje další přenos signálu. Následující změny spojené s uvolněním intracelulárního kalcia, usnadňují degranulaci mastocytů a aktivují transkripční faktory v buněčném jádře s následnou tvorbou nových mediátorů a cytokinů. [4,6]



Obr.2: Aktivace mastocytu. Dětská alergologie, Vít Petrů a kol. [6], str.58.

3.2.2 Orální alergický syndrom

Orální alergický syndrom je jednou z nejčastějších forem potravinové alergie. Jedná se o soubor orálních příznaků, které se u pacienta rozvíjí bezprostředně po požití potravin rostlinného původu, ale alergie je primárně pylově asociovaná. Proto se v současné době užívá termín pylově-potravinový syndrom, jehož podstatou je rozsáhlá zkřížená reaktivita mezi pyly a potravinami rostlinného původu daná existencí podobných či dokonce stejných alergenů jak v potravě, tak v pylu. [4]

Mezi charakteristické příznaky OAS rozvíjející se ihned po požití potravin patří pálení a svědění patra, jazyka nebo rtů, porucha polykání, kýchání a obstrukce nosu, exantém a otok v oblasti obličeje, výjimkou není ani rozvoj anafylaktické reakce. [4]

3.2.2.1 Zkřížená reaktivita

Fenomén zkřížené alergie hraje klíčovou roli v oblasti potravinových alergií a je založen na podobnosti alergenových složek pylu a potravy. [6]

Potravinové alergeny mají glykoproteinovou strukturu. Ale v procesu senzibilizace jsou klíčové pouze malé úseky polypeptidového řetězce. Jedná se o specifické sekvence několika aminokyselin, které nazýváme epitopy. Zkřížená reaktivita se objeví tehdy, reaguje-li protilátka proti určitému epitopu s podobným nebo totožným epitopem, jenž je součástí jiného antigenu [9].

Rozhodující vlastností pro rozvoj zkřížené reakce alergenů je tedy shodnost nebo alespoň podobnost (homologie) jejich bílkovin. Shoda epitopů jednotlivých druhů v rámci botanických nebo zoologických tříd je pochopitelná. Ovšem v případě potravinové alergie se setkáváme s výraznou homologií i u velmi rozdílných tříd. [4] Tyto fylogeneticky podobné, vysoce homologní bílkoviny nazýváme panalergeny. Shodnost aminokyselinových sekvencí dosahuje různých hladin, homologii dosahující 70% lze považovat za hodnotu, která má za následek zkříženou reaktivitu [10]. Zkřížená alergická reakce je tedy důsledkem vazby specifické IgE protilátky na bílkovinu, která primárně nevyvolala její tvorbu. [6]

Mezi nejrozšířenější interakce patří syndrom bříza-ovoce-zelenina-ořechy, syndrom celer-mrkev-pelyněk-bříza-koření, „latex-fruit“ syndrom, syndrom vejce-pták.

V posledních dvaceti letech minulého století nastala revoluce v odhalování alergicko-imunologických pochodů na molekulární úrovni, včetně přesné definice oligopeptidů a polypeptidů organických antigenů. Dnes už dokážeme určit přesnou sekvenci aminokyselin každého alergenu, včetně karbohydrátových determinant, které často hrají důležitou roli v afinitě antigenu k IgE. Přední světové laboratoře dokáží odhalit kritická místa vazby těchto aminokyselinových sekvencí s IgE-specifickou protilátkou a dokonce díky genovému inženýrství i do těchto epitopů mutageně vstupovat, a tím ovlivňovat původní alergenicitu antigenu. [5]

3.2.3 Alergeny

Alergeny jsou definovány jako antigeny, které reagují se specifickými protilátkami v třídě IgE, obvykle proteinové struktury. Alergeny rozdělujeme do dvou skupin na alergeny hlavní a vedlejší.

Hlavní alergeny jsou ty, proti kterým jsou pozitivní specifické protilátky IgE u většiny nemocných (obvykle 90% osob). Charakteristická je také jejich pozitivita kožních testů. Hlavní alergeny najdeme ve všech testovacích soupravách.

Vedlejší alergeny vyvolávají reakci u pouze malé části postižených osob (5-10%) , tato reakce může mít jiné příznaky než reakce vyvolaná hlavními alergeny. Vedlejší alergeny jsou velmi často příčinou zkřížené reaktivity biologicky příbuzných organismů i evolučně velmi vzdálených organismů.

Každý alergen má své označení, které se tvoří z prvních třech písmen rodu, následuje první písmeno druhu a číslo, které vyjadřuje, kdy bylo dosaženo purifikace. [4]

3.2.3.1 Panalergeny

Panalergeny jsou vysoce homologní alergenů, u nichž shoda v charakteristických aminokyselinových sekvencích dosahuje minimálně 80%. Jsou zodpovědné za zkřížené reakce. V současné době mezi nejvýznamnější panalergeny řadíme rodinu ribonukleáz stromů-plodů-listů-kořenů-semen (PR-10 protein), rodinu profilinů ovoce a zeleniny, LTP, tropomyosin korýšů, měkkýšů a roztočů.

3.2.3.1.1 PR-10 protein

Patří mezi rostlinné bílkoviny, které zajišťují obranyschopnost rostlin a chrání je před nepříznivými vlivy prostředí, nacházejí se v ovoci, zelenině a některých ořechách. PR-10 protein má potenciál zkříženě reagovat díky vysoké homologii s alergenem břízy Bet v 1.

3.2.3.1.2 Profiliny

Profiliny jsou součástí cytoskeletu eukaryotických buněk a jsou zapojeny do biologických odpovědí rostlinných buněk na světlo, gravitaci či působení růstových hormonů. Prototypem profilinů je alergen břízy Bet v 2, další byly popsány např. u jablka, hrušky, celeru, mrkve, arašíd, ale také v pylu pelyňku nebo slunečnice. [7]

3.2.3.1.3 Protein LTP

Jedná se o Lipid Transfer Protein, má nízkou molekulovou hmotnost, je vysoce stabilní, odolný vůči působení proteáz. LTP je jednou z příčin zkřížené reaktivity na potravinové alergenů. Především se jedná o alergenů ovoce. Je hlavním alergenem jablka a broskve. Nevyskytuje se v pylových zrnech.

3.2.3.2 Alergenicita

Schopnost alergenu vyvolat alergickou reakci nezávisí jen na přesném chemickém složení alergenu, ale také na prostorovém uspořádání jeho proteinové struktury. Uspořádání molekuly může být lineární nebo prostorové. Pořadí krátkých lineárních úseků se ohybem změnit nemusí. Prostorové uspořádání molekuly je citlivější a k rozpadu struktury postačí malý zásah, např. působení tepla, enzymů nebo změna pH prostředí. [6]

Vařením se potravina obvykle stává bezpečnou, zejména je-li alergenem profilin nebo PR-10 protein. Naopak LTP je vysoce termostabilní a může vyvolávat příznaky i po požití tepelně upravených potravin. [11]

3.3 Laboratorní diagnostika potravinové alergie

Přesnost diagnostiky potravinové alergie má význam nejen pro správnou léčbu, ale také pro vyvarování se zbytečných dietních omezení pacienta. Diagnostika suspektní potravinové alergie je založena na anamnéze, kožních prick testech a nedílnou součástí je laboratorní měření specifických IgE protilátek v séru.

3.3.1 Technologie mikropolí

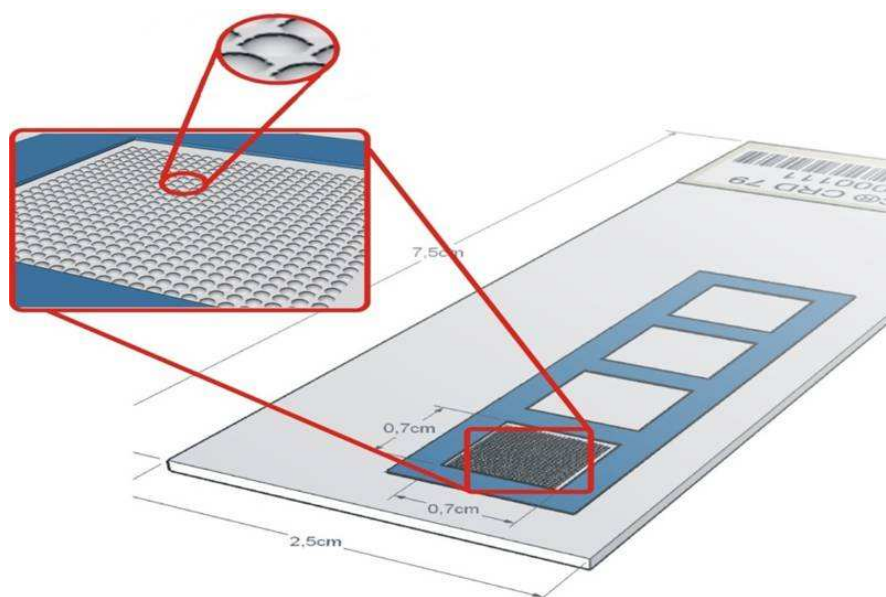
Tato technologie využívá velkokapacitní mikropole, tzv. microarray, které mají na proteinové podložce fixované jednotlivé alergenové složky. Metodika mikropolí nám umožňuje stanovení specifického IgE proti mnoha molekulám během jednoho vyšetření a tím i přesnější diagnostiku potravinové alergie, neboť nám pomáhá vytvořit profil senzibilizace pacienta. Provádíme tedy molekulární diagnostiku neboli diagnostiku pomocí alergenových složek. [5]

3.3.1.1 Technologie ImmunoCAP® ISAC

Prototyp ISAC (Immuno Solid-phase Alergen Chip) je vyrobený společností Phadia. Jedná se o inovativní metodu založenou na moderní technologii biočipů využívající čistých rekombinantních nebo přírodních alergenů. Tento in vitro test je dodáván ve třech různých sadách, které nám umožňují semi-kvantitativní stanovení specifických protilátek IgE, IgG nebo IgG4 v séru. Je určen k diagnostice v kombinaci s klinickými nálezy. [12]

3.3.1.1.1 Charakteristika biočipu

Biočip je tvořen pevným proteinovým substrátem, na který jsou uchyceny různé biologické molekuly (molekuly alergenů) uspořádané v tripletech. Takto vytvořená mikroskopická sada umožňuje souběžné pozorování biologických interakcí s minimálním množstvím vzorku a reagensů.



Obr.3: Testovací sklo se sadami mikropolí.[12]

Proteinová báze s fixovanými alergenovými složkami je uchycena na standardizovaném skle o rozměrech 26x76 mm. Každé mikropole má tvar kolečka o velikosti 250 μm , na němž je nanášeno 300 pg antigenu. [12]

3.3.1.1.2 Princip stanovení

Principem metody ISAC je imunofluorometrické stanovení sIgE. Po nanesení vzorku séra na podložní sklo s multiplexem dochází k aktivaci fixovaných rekombinantních alergenů působením vodného prostředí. Během inkubace dochází, v případě positivity sIgE v séru, k tvorbě vazby mezi sIgE a alergenem. Tato vazba je následně vizualizovaná reakcí s konjugátem anti-IgE, který označen fluorescenčním barvivem.

3.3.1.1.3 Vyhodnocení měření

Vyhodnocení intenzity fluorescencí na jednotlivých pozicích odpovídajících jednotlivým rekombinantním alergenům se provádí ve speciálním readru LuxScan 10K. Míra intenzity fluorescence odpovídá pozitivitě sIgE, naměřené hodnoty sIgE se odečítají proti kalibrační křivce pomocí softwaru MIA. Výsledky měření jsou uvedeny v jednotkách ISU (ISAC standardized units).

3.3.1.1.4 Rekombinantní alergeny

Rekombinantní alergeny jsou naprosto čisté, stabilní alergeny bez genetické proměnlivosti, získávané pomocí genetického inženýrství. Jejich význam spočívá v přesnosti konkrétní proteinové struktury, která je specifickým nositelem alergenního potenciálu. Nejčastějším organismem pro klonování je bakterie *Escherichia coli*. [6]

3.3.1.1.5 Alergenový panel

Metoda ISAC umožňuje stanovení sIgE proti 103 (ve své nejnovější verzi již proti 112) alergenovým složkám. Panel obsahuje hlavní alergenové složky významných alergenových zdrojů v Evropě. Obsahuje 47 potravinových alergenů. [12]

3.3.1.1.6 Výhody metody

Z pohledu pacienta se jedná o neinvazivní diagnostický postup. Přináší řadu výhod, mezi které patří miniaturizace této metody. Stanovení se provádí v rozsahu μm a s tím souvisí i malé množství vzorků a reagenčního materiálu potřebné k testu. Dále je přínosem mnohočetnost stanovení, která nám umožňuje vytvořit komplexní imunologický profil z hlediska senzibilizace pacienta na základě jednoho testu. Z pohledu odborného personálu je jistě výhodou i relativní rychlost a automatizace stanovení.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakteristika souboru

Do souboru byli zařazeni dospělí pacienti průměrného věku 35,3 let (věkové rozpětí 19 – 64 let), z toho 11 mužů a 29 žen. Vstupním kritériem byla vazba na pylové alergen dle prick testů a anamnézy, kdy pacienti museli současně udávat klinické příznaky ve smyslu orálního alergického syndromu, pylově asociovaného. Soubor byl sestaven ze spolupracujících pacientů, kteří souhlasili se zpracováním vzorků a jsou v ambulantní péči ÚKIA FNHK. Sběr vzorků a anamnestických dat probíhal 7 měsíců, v období od 1.7. 2011 – 30.1. 2012.

4.2 Pojmy

4.2.1 Fluorescence

Fluorescence je jev spočívající ve schopnosti některých látek (fluoroforů) emitovat po excitaci světlem určité vlnové délky $\lambda(\text{excit})$ světlo jiné vlnové délky, platí $\lambda(\text{emit}) > \lambda(\text{excit})$.

4.2.2 Specifické IgE

Alergen-specifické IgE protilátky se přímo uplatňují v patogenezi alergické reakce vůči danému alergen. Po jejich vazbě na alergen spouštějí uvolnění mediátorů alergické reakce žírnými buňkami a bazofily.

4.3 Princip metody

Na podložním skle jsou v tripletech nanášeny rekombinantní alergeny, které reagují se specifickým IgE v séru. Tato vazba je následně vizualizována pomocí reakce s protilátkou proti IgE označenou specifickým fluorochromem. Takto připravené sklo je snímáno fluorescenční kamerou s rozlišením lepším než 10 μm . Následně na podkladě intenzit fluorescence je výsledek odečten z kalibrační křivky.[13]

4.4 Vzorky

Vzorky žilní krve musí být odebrány do sterilních zkumavek bez antikoagulačních činidel. Po řádném sražení se krevní vzorek standardně centrifuguje. Sérum je možné uchovávat při 2-8 °C po dobu 24 hodin. Pro delší uchování vzorku je nutné vzorek zamrazit na -20 °C.[13]

4.5 Přístroje

Přístroj ISAC

Cytospin

4.6 Reagenční aparát

Kit *ImmunoCAP ISAC® sIgE 103*:

Reakční skla - 5 skel se 4 pozicemi pro stanovení

Komponent A - reakční pufr

IgE detection antibody - detekční protilátka značená fluorescenční barvou

IgE control serum - kalibrační sérum

Kit *ImmunoCAP ISAC® sIgE 112*:

Reakční skla - 5 skel se 4 pozicemi pro stanovení

IgE detection antibody - detekční protilátka značená fluorescenční barvou

IgE control serum - kalibrační sérum

4.7 Pomůcky

Promývací kyveta

Vlhká komůrka

Magnetické míchadlo

4.8 Postup přípravy skel

1. Všechny potřebné reagenty necháme vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Připravíme vlhkou komůrku.
3. Naředíme zásobní pufr component A 20x destilovanou vodou.
4. Na jednotlivé reakční pozice nakapeme 20 μ l kontroly nebo neředěného séra.
5. Inkubujeme 120 minut ve tmě.
6. Po uplynutí inkubace sklo opláchneme ve zředěném pufru a umístíme do kyvety s reakčním pufrem, inkubujeme 10 minut za stálého míchání pomocí magnetického míchadla.
7. Po inkubaci umístíme skla do kyvety s destilovanou vodou, inkubujeme 5 minut za stálého míchání pomocí magnetického míchadla.
8. Skla opatrně osušíme a umístíme je do držáku skla pro cytospin tak, že čárový kód je umístěn v dolní části držáku.
9. Spustíme cytospin nastavený na 450 otáček/ min. na dobu 5 minut.
10. Pokud jsou skla zcela suchá, umístíme je zpět do vlhké komůrky.
11. Na každou reakční jamku nanese 20 μ l detekční protilátky anti-IgE, inkubujeme 60 minut ve tmě.
12. Po uplynutí inkubace sklo opláchneme ve zředěném pufru a umístíme do kyvety s reakčním pufrem, inkubujeme 10 minut za stálého míchání pomocí magnetického míchadla.
13. Po inkubaci umístíme skla do kyvety s destilovanou vodou, inkubujeme 5 minut za stálého míchání pomocí magnetického míchadla.
14. Skla necháme zaschnout ve tmě.
15. Skla analyzujeme pomocí přístroje ISAC.
16. Skla ukládáme do boxu pro skladování.

4.9 Analýza skel

Připravená skla se naskenují pomocí speciálního readru (LuxScan 10K), který vyhodnotí intenzity fluorescence na pozicích jednotlivých rekombinantních alergenů. Na základě tohoto vyhodnocení se pomocí softwaru MIA odečítají hodnoty sIgE proti kalibrační křivce. Výsledky jsou uváděny v ISAC standardized units (ISU).[13]

4.10 Testované alergenové složky

Rostlinné alergen

Code	Name	Latin name
f416	rTri a 19 Omega-5 Gliadin, Wheat	<i>From Triticum aestivum</i>
f354	rBer e 1 Brazil nut	<i>Bertholletia excelsa</i>
f352	rAra h 8 PR-10, Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>
f353	rGly m 4 PR-10, Soy	<i>Glycine max</i>
f417	rApi g 1.01 PR-10, Celery	<i>Apium graveolens</i>
f419	rPru p 1 PR-10, Peach	<i>Prunus persica</i>
f421	rPru p 4 Profilin, Peach	<i>Prunus persica</i>
f420	rPru p 3 LTP, Peach	<i>Prunus persica</i>
f422	rAra h 1 Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>
f423	rAra h 2 Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>
f424	rAra h 3 Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>
f427	rAra h 9 LTP, Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>
f428	rCor a 1 PR-10, Hazel nut	<i>Corylus avellana</i>
f430	rAct d 8 PR-10, Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>
f425	rCor a 8 LTP, Hazel nut	<i>Corylus avellana</i>

Živočišné alergen

Code	Name	Latin name
e101	rCan f 1 Dog	<i>Canis familiaris</i>
e102	rCan f 2 Dog	<i>Canis familiaris</i>
e204	nBos d 6 BSA, Cow	<i>Bos spp.</i>

Code	Name	Latin name
e221	nCan f 3 Dog serum albumin	<i>Canis familiaris</i>
e222	nSus s Pig serum albumine, Swine	<i>Sus scrofa</i>
e94	rFel d 1 Cat	<i>Felis domesticus</i>
e220	nFel d 2 Cat	<i>Felis domesticus</i>
<i>Pylové alergený trav</i>		
Code	Name	Latin name
g205	rPhl p 1 Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g213	rPhl p 1, rPhl p 5b Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g215	rPhl p 5b Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g211	rPhl p 11 Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g212	rPhl p 12 Profilin, Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g206	rPhl p 2 Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g209	rPhl p 6 Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g210	rPhl p 7 Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g214	rPhl p 7, rPhl p 12 Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g208	nPhl p 4 Timothy	<i>Phleum pratense</i>
g216	nCyn d 1 Bermuda grass	<i>Cynodon dactylon</i>
<i>Potravinové alergený živočišného původu</i>		
Code	Name	Latin name
f323	nGal d 3 Conalbumin, Egg	<i>Gallus domesticus</i>
f232	nGal d 2 Ovalbumin, Egg	<i>Gallus domesticus</i>
f233	nGal d 1 Ovomucoid, Egg	<i>Gallus domesticus</i>
f76	nBos d 4 α -lactalbumin, Milk	<i>Bos domesticus</i>
f77	nBos d 5 β -lactoglobulin, Milk	<i>Bos domesticus</i>
f334	nBos d Lactoferrin, Milk	<i>Bos domesticus</i>
f351	rPen a 1 Tropomyosin, Shrimp	<i>Penaeus aztecus</i>
f355	rCyp c 1 Carp	<i>Cyprinus carpio</i>
f426	rGad c 1, Cod	<i>Gadus morhua</i>
e204	nBos d 6 Serum albumin, Milk	<i>Bos domesticus</i>
f78	nBos d 8 Casein, Milk	<i>Bos domesticus</i>
<i>Pylové alergený plevelů</i>		
Code	Name	Latin name
w211	rPar j 2 LTP, Wall pellitory	<i>Parietaria judaica</i>

Code	Name	Latin name
w232	nSal k 1	<i>Salsola kali</i>
w231	nArt v 1 Mugwort	<i>Artemisia vulgaris</i>
w233	nArt v 3 LTP, Mugwort	<i>Artemisia vulgaris</i>
w230	nAmb a 1 Ragweed	<i>Ambrosia elatior</i>

Pylové alergený stromů

Code	Name	Latin name
t216	rBet v 2 Profilin, Birch	<i>Betula verrucosa</i>
t220	rBet v 4 Birch	<i>Betula verrucosa</i>
t221	rBet v 2, rBet v 4 Birch	<i>Betula verrucosa</i>
t225	rBet v 6 Birch	<i>Betula verrucosa</i>
t224	nOle e 1 Olive	<i>Olea europaea</i>
t215	rBet v 1 PR-10, Birch	<i>Betula verrucosa</i>
t226	nCup a 1	<i>Cupressus arizonica</i>

Pracovní alergený

Code	Name	Latin name
k215	rHev b 1 Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>
k224	rHev b 11 Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>
k217	rHev b 3 Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>
k218	rHev b 5 Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>
k219	rHev b 6.01 Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>
k220	rHev b 6.02 Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>
k221	rHev b 8 Profilin, Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>
k222	rHev b 9 Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>
k87	nAsp o 1 alpha-amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>
k205	Alkalase	<i>Bacillus spp.</i>
k202	nAna c 2 Bromelin, Pineapple	
k208	nGal d 4 Lysozyme, Egg	
k204	Maxatase	<i>Bacillus licheniformis</i>
k201	nCar p 1 Papain, Papaya	
k213	nSus s Pepsin, Swine	
k206	Savinase	<i>Bacillus spp</i>

Alergeny plísňí a mikroorganismů

Code	Name	Latin name
m218	rAsp f 1	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Code	Name	Latin name
m219	rAsp f 2	<i>Aspergillus fumigatus</i>
m220	rAsp f 3	<i>Aspergillus fumigatus</i>
m221	rAsp f 4	<i>Aspergillus fumigatus</i>
m222	rAsp f 6	<i>Aspergillus fumigatus</i>
m229	rAlt a 1	<i>Alternaria alternata/Alternaria tenuis</i>

Různé

Code	Name	Latin name
o214	o214 Allergen component MUXF3 CCD, Bromelain	

Alergeny roztočů

Code	Name	Latin name
d202	nDer p 1 House dust mite	<i>Dermatophagoides Pteronyssinus</i>
d203	rDer p 2 House dust mite	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
d205	rDer p 10 Tropomyosin, House dust mite	<i>Dermatophagoides Pteronyssinus</i>

Alergeny jedů

Code	Name	Latin name
i208	rApi m 1 Phospholipase A2, Honey bee	<i>Apis mellifera</i>
i209	rVes v 5 Vespula	<i>Vespula</i>
i210	rPol d 5 Recombinant protein Antigen 5,	<i>Polistes</i>

Pozn.: Zdroj www.phadia.com

4.11 Metody statistického zpracování výsledků

Na základě získaných anamnestických dat a naměřených laboratorních hodnot sIgE byly sestaveny kontingenční tabulky vyjadřující vztah těchto dvou proměnných u vybrané skupiny alergenů. Vazba mezi těmito proměnnými je statisticky vyhodnocena pomocí Chí-kvadrátu a Spearmannova korelačního koeficientu.

4.11.1 Kontingenční tabulka

Kontingenční tabulka popisuje vzájemný vztah dvou proměnných. Sloupce tabulky odpovídají hodnotám první proměnné a řádky tabulky odpovídají hodnotám druhé proměnné. Pro účely této práce jsou kontingenční tabulky sestaveny tak, že ve sloupcích je vždy přítomnost či absence klinických projevů po požití konkrétní potravin, v řádcích jsou četnosti dle míry positivity sIgE v kategoriích 0-3. Pomocí kontingenční tabulky lze určit specifitu a sensitivitu testu.

4.11.2 Pearson Chí-kvadrát

Statistická metoda Pearson Chí-kvadrát, nebo-li test dobré shody, nám odpovídá na otázku, zda jsou rozdíly mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi náhodné či ne. Patří mezi základní statistiky. Využívá se v oblasti hodnocení kategoriálních dat. Jako kategoriální data označujeme kvalitativní proměnné, u nichž určíme pouze rovnost či různost při sledování. Při sledování výskytu kategoriální proměnné v závislosti na druhé proměnné v souboru interpretujeme výsledky dvěma způsoby. A to tak, že náhodný jev nastane (nenastane) s pravděpodobností p (q). Hodnota p je pravděpodobnost, s níž odchylka získaných hodnot od předpokládaných hodnot vzniká v důsledku náhody. V rámci hodnocení výsledků této práce nám hodnota p vyjadřuje, zda uvedené měření mělo nějaký statisticky významný vztah k diagnostice příslušného klinického stavu. Čím více se hodnota p blíží nule, tím menší je pravděpodobnost, že vztah dvou proměnných je náhodný.

4.11.3 Spearmannův korelační koeficient

Jedná se o korelační koeficient, který nám vyjadřuje stupeň závislosti dvou proměnných. Nabývá hodnot 0-1, čím více se hodnota blíží 1, tím je shoda větší. V rámci této práce se zaměříme na korelaci mezi klinickými projevy a pozitivitou sIgE.

5. VÝSLEDKY

5.1. Výsledky měření

Tab. 1: Výsledky měření potravinových alergenů (kategorie 0-3) – část 1

Vzorek	<i>Kiwi</i>				<i>Kešu</i>	<i>Celer</i>	<i>Arašídý</i>	
	Act d 1	Act d 2	Act d 5	Act d 8	Ana o 2	Api g 1	Ara h 1	Ara h 2
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	2	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	3	0	1	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	1	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	2	0	1	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	2	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	1	0	2	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	1	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 1: Výsledky měření potravinových alergenů (kategorie 0-3) – část 2

Vzorek	<i>Arašíd</i>				<i>Lísk. oříšek</i>			<i>Sója</i>
	<i>Ara h 3</i>	<i>Ara h 6</i>	<i>Ara h 9</i>	<i>Ara h 8</i>	<i>Cor a 1.0401</i>	<i>Cor a 8</i>	<i>Cor a 9</i>	<i>Gly m 4</i>
1	0			0	0	0	0	0
2	0			0	0	0	0	0
3	0			0	1	0	0	0
4	0			2	3	0	0	2
5	0			0	0	0	0	0
6	0			2	2	0	0	0
7	0			1	2	0	0	1
8	0			0	0	0	0	0
9	0			0	0	0	0	0
10	0			0	0	0	0	0
11	0			2	2	0	0	1
12	0			3	2	0	0	2
13	0			0	0	0	0	0
14	0			2	2	0	0	2
15	3			0	0	0	2	0
16	0			1	0	0	0	0
17	0			2	2	0	0	0
18	0			0	0	0	0	0
19	0			0	0	0	0	0
20	0			1	2	0	0	2
21	0	0	0	0	2	0	0	2
22	0	0	0	2	2	0	0	2
23	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	2	2	0	0	1
25	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	2	3	0	0	2
27	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	2	2	0	0	2
32	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	2	0	0	0
35	0	0	0	2	2	0	0	2
36	0	0	0	2	3	0	0	2
37	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	1	0	0	0
39	0	0	0	0	2	0	0	0
40	0	0	0	0	2	0	0	0

Tab. 1: Výsledky měření potravinových alergenů (kategorie 0-3) – část 3

Vzorek	<i>Sója</i>		<i>Latex</i>					
	Gly m 5	Gly m 6	Hev b 1	Hev b 3	Hev b 5	Hev b 6	Hev b 8	MUXF3
1	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	2	
8	0	0	0	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	
11	0	0	0	0	0	0	0	
12	0	0	0	0	0	0	2	
13	0	0	0	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	0	0	0	
15	0	0	0	0	0	0	0	
16	0	0	0	0	0	0	2	
17	0	0	0	0	0	0	0	
18	0	0	0	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	0	0	
21	0	0	0	0	0		0	0
22	0	0	0	0	0		2	0
23	0	0	0	0	0		2	0
24	0	0	0	0	0		0	0
25	0	0	0	0	0		0	0
26	0	0	0	0	0		2	0
27	0	0	0	0	0		0	0
28	0	0	0	0	0		0	0
29	0	0	0	0	0		0	0
30	0	0	0	0	0		0	0
31	0	0	0	0	0		0	0
32	0	0	0	0	0		2	0
33	0	0	0	0	0		0	0
34	0	0	0	0	0		0	0
35	0	0	0	0	0		0	0
36	0	0	0	0	0		0	0
37	0	0	0	0	0		0	0
38	0	0	0	0	0		0	0
39	0	0	0	0	0		0	0
40	0	0	0	0	0		0	0

Tab. 1: Výsledky měření potravinových alergenů (kategorie 0-3) – část 4

Vzorek	<i>Latex</i>	<i>Vlašský ořech</i>			<i>Jablko</i>	<i>Broskev</i>		<i>Sezam</i>
	Hev b 6.	Jug r 1	Jug r 2	Jug r 3	Mal d 1	Pru p 1	Pru p 3	Ses i 1
1					0	0	0	0
2					0	0	0	0
3					1	2	0	0
4					3	3	0	0
5					0	0	0	0
6					2	2	0	0
7					1	2	0	0
8					0	0	0	0
9					0	0	0	0
10					0	0	0	0
11					2	2	0	0
12					2	3	0	0
13					0	0	0	0
14					3	2	0	0
15					0	0	0	2
16					0	2	0	0
17					1	2	0	0
18					0	0	0	0
19					0	0	0	0
20					2	2	0	0
21	0	0	0	0	2	2	0	0
22	0	0	0	0	2	2	0	0
23	0	0	0	0	0	2	0	0
24	0	0	0	0	2	2	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	3	2	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	3	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	2	2	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	2	0	0	0
35	0	0	0	0	3	2	0	0
36	0	0	1	0	3	3	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	2	0	0	0
39	0	0	0	0	2	0	0	0
40	0	0	0	0	2	2	0	0

Pozn.: Rozdělení do kategorií 0-3 dle úrovně sensibilizace

Tab. 2: Výsledky měření pylových alergenů (kategorie 0-3) – část 1

Vzorek	<i>Líska-pyl</i>	<i>Olše</i>	<i>Bříza</i>			<i>Platan</i>		
	Cor a 1.0101	Aln g 1	Bet v 1	Bet v 2	Bet v 4	Pla a 1	Pla a 2	Pla a 3
1	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	1	
3	0	2	2	0	0	0	0	
4	2	3	3	0	0	0	2	
5	0	0	0	0	0	0	0	
6	2	2	2	0	0	0	0	
7	0	0	2	1	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	
11	2	2	3	0	0	0	0	
12	2	2	3	2	0	0	0	
13	0	0	0	0	0	0	0	
14	2	3	3	0	0	0	2	
15	0	0	0	0	0	0	0	
16	2	2	2	2	2	0	1	
17	2	2	2	0	0	0	0	
18	0	0	0	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	0	0	0	
20	2	2	3	0	0	0	0	
21	2	2	2	0	0	0	0	0
22	2	3	3	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0
24	2	2	3	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0
26	2	3	3	2	0	0	2	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0
31	2	0	2	0	0	0	0	0
32	0	0	0	2	0	0	0	0
33	0	0	2	0	0	0	0	0
34	2	0	2	0	0	0	0	0
35	2	3	3	0	0	0	0	0
36	2	3	3	0	0	0	2	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	2	0	0	0	0	0
39	0	0	2	0	0	0	0	0
40	2	2	3	0	0	0	0	0

Tab. 2: Výsledky měření pylových alergenů (kategorie 0-3) – část 2

Vzorek	<i>Platan</i>	<i>Pšenice</i>					<i>Bojínek</i>	
	Pla I 1	Tri a 18	Tri a 14	Tri a Gli.	Tri a 19.	Tri a aA	Phl p 1	Phl p 11
1		0		0	0	0	0	0
2		0		0	0	0	3	1
3		0		0	0	0	1	0
4		0		0	0	0	2	0
5		0		0	0	0	0	0
6		0		0	0	0	0	0
7		0		0	0	0	2	0
8		0		0	0	0	0	0
9		0		0	0	0	0	0
10		0		0	0	0	0	0
11		0		0	0	0	3	2
12		0		0	0	0	1	1
13		0		0	0	0	2	0
14		0		0	0	0	2	0
15		0		0	0	0	0	0
16		0		0	0	0	3	2
17		0		0	0	0	0	0
18		0		0	0	0	0	0
19		0		0	0	0	0	0
20		0		0	0	0	0	0
21	2		0		0	0	2	0
22	1		0		0	0	3	0
23	2		0		0	0	3	0
24	0		0		0	0	3	1
25	0		0		0	0	3	2
26	2		0		0	0	0	0
27	0		0		0	0	2	0
28	0		0		0	0	0	0
29	0		0		0	0	2	0
30	0		0		0	0	0	0
31	0		0		0	0	1	0
32	0		0		0	0	2	0
33	0		0		0	0	0	0
34	1		0		0	0	2	0
35	0		0		0	0	2	0
36	0		0		0	0	2	2
37	0		0		0	0	0	0
38	0		0		0	0	0	0
39	0		0		0	0	2	0
40	0		0		0	0	1	0

Tab. 2: Výsledky měření pylových alergenů (kategorie 0-3) – část 3

Vzorek	<i>Bojíněk</i>						<i>Ambroz.</i>	<i>Cypřiš</i>
	Phl p 12	Phl p 2	Phl p 4	Phl p 5	Phl p 6	Phl p 7	Amb a 1	Cup a 1
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	0	0	0	0	1
3	0	0	2	1	0	0	0	0
4	0	0	2	0	0	0	0	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	1	0	2	2	0	2	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	2	2	3	2	0	0	0
12	1	0	0	0	0	0	2	1
13	0	3	0	0	0	0	0	0
14	0	0	2	3	1	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	2	2	2	2	3	2	2	2
17	0	0	0	2	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	2	1	0	0	0
22	0	2	2	2	2	0	0	0
23	2	0	0	2	2	0	0	0
24	0	3	2	3	2	0	0	0
25	0	2	2	0	0	1	0	0
26	2	0	2	2	0	0	0	2
27	0	0	2	1	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	2	2	2	2	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	1	2	0	0	3	0
33	0	0	1	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	2	2	2	0	0	0	0
36	0	2	0	0	0	0	0	2
37	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	1	0	0	0	0	0
39	0	2	0	0	0	0	0	0
40	0	0	1	0	0	0	0	0

Tab. 2: Výsledky měření pylových alergenů (kategorie 0-3) – část 4

Vzorek	<i>Troskut</i>	<i>Bažanka</i>	<i>Oliva</i>				<i>Cryptom.</i>
	Cyn d 1	Mer a 1	Ole e 1	Ole e 2	Ole e 7	Ole e 9	Cry j 1
1	0	0	0	0			0
2	2	0	0	0			1
3	0	0	0	0			0
4	2	0	2	0			2
5	0	0	0	0			0
6	0	0	2	0			0
7	0	2	2	1			0
8	0	0	0	0			0
9	0	0	0	0			0
10	0	0	0	0			0
11	2	0	1	0			0
12	0	2	2	1			1
13	0	0	0	0			0
14	2	0	2	0			0
15	0	0	0	0			0
16	0	2	0	2			2
17	0	0	0	0			0
18	0	0	0	0			0
19	0	0	0	0			0
20	0	0	0	0			0
21	1	0	0		0	0	0
22	2	1	0		0	0	0
23	2	0	0		0	0	0
24	2	0	0		0	1	0
25	2	0	0		0	0	0
26	2	1	2		0	0	2
27	2	0	0		0	0	0
28	0	0	0		0	0	0
29	1	0	0		0	0	0
30	0	0	0		0	0	0
31	0	0	0		0	0	0
32	2	2	0		0	0	0
33	0	0	0		0	0	0
34	1	0	0		0	0	0
35	2	0	0		0	0	0
36	0	0	1		0	0	2
37	0	0	0		0	0	0
38	0	0	0		0	0	0
39	1	0	0		0	0	0
40	1	0	0		0	0	0

Pozn.: Rozdělení do kategorií 0-3 dle úrovně sensibilizace.

Tab. 3: Výsledky anamnézy (klinické projevy) – část 1

Pacient	<i>Jablko</i>	<i>Lísk.oř.</i>	<i>Vlaš.oř.</i>	<i>Broskev</i>	<i>Kiwi</i>	<i>Rajče</i>	<i>Mrkev</i>	<i>Celer</i>	<i>Třešně</i>
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	1	0	1	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	1	0	0	0	1
5	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	1	0	0	0	0	1
7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1	1	1	0	0	0	0	0	0
12	1	1	0	0	0	0	0	1	1
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0	0	1	1	0	0	0	0
15	0	1	1	0	0	0	0	0	0
16	0	1	1	0	0	0	0	0	0
17	0	1	0	0	0	0	1	0	0
18	0	0	0	0	0	1	0	0	0
19	1	1	1	1	0	0	0	1	0
20	1	1	1	1	0	0	0	0	1
21	1	1	0	0	1	1	1	0	0
22	1	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	1	0	0	0	0	0	0
24	1	0	1	0	1	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	1	1	0
26	0	0	0	0	0	0	0	1	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	1	0	1	1	0	0	0
30	0	1	1	0	0	0	0	1	0
31	1	1	0	0	0	1	0	0	0
32	0	0	0	0	0	1	1	1	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	1	1	1	1	1	1	1	0	1
35	1	0	0	1	0	0	1	0	0
36	1	1	1	0	1	0	0	0	0
37	1	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	1	1	0	0	0	0	0	0
40	1	1	0	0	0	0	0	0	1

Tab.3: Výsledky anamnézy (klinické projevy) – část 2

Pacient	<i>Arašídý</i>	<i>Latex</i>	<i>Nektarin.</i>	<i>Sezam</i>	<i>Banán</i>	<i>Sója</i>	<i>Kešu</i>
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0	0	0	0	1	0
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	1	0	1	0
16	1	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	1	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	1	0	0	0	0
32	0	1	0	0	1	0	0
33	0	0	0	1	0	0	0
34	0	0	1	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0
36	1	0	0	0	1	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0

Pozn.1: Pacienti č. 1 a č. 38 nedokázali určit alergizující potravinu, z tohoto důvodu jsou v tabulce uvedeny nulové hodnoty u všech potravin.

Pozn.2: Rozdělení do kategorií 0-1 na základě positivity klinických příznaků

5.2 Statistické zpracování

Tato práce je zaměřena na zkříženou reaktivitu potravinových a pylových alergenů, zejména na vztah mezi klinickými příznaky jablka, lískového ořechu, broskve a pozitivitou sIgE proti vlastním (Mal d 1, Cor a 1.0401, Pru p 1) a pylovým alergenům (Bet v 1, Aln g 1). V tomto vztahu je zkřížená reaktivita založena na PR-10 proteinu, panalergenu z rodiny ribonukleáz.

5.2.1 Kontingenční tabulky

Lísk. ořech * klinicky lískový ořech

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití lískového ořechu a pozitivitou sIgE proti alergenů lískového ořechu Cor a 1.04. Sensitivita testu je 68,75%, specificita testu je 62,5%, korelační koeficient není signifikantní.

			klin lísk ořech		Total
			,00	1,00	
Lísk. ořech	,00	Count	15	5	20
		% within Lísk. oříšek	75,0%	25,0%	100,0%
		% within klin lísk ořech	62,5%	31,3%	50,0%
		% of Total	37,5%	12,5%	50,0%
	1,00	Count	2	0	2
		% within Lísk. oříšek	100,0%	,0%	100,0%
		% within klin lísk ořech	8,3%	,0%	5,0%
		% of Total	5,0%	,0%	5,0%
	2,00	Count	5	10	15
		% within Lísk. oříšek	33,3%	66,7%	100,0%
		% within klin lísk ořech	20,8%	62,5%	37,5%
		% of Total	12,5%	25,0%	37,5%
	3,00	Count	2	1	3
		% within Lísk. oříšek	66,7%	33,3%	100,0%
		% within klin lísk ořech	8,3%	6,3%	7,5%
		% of Total	5,0%	2,5%	7,5%
Total	Count	24	16	40	
	% within Lísk. oříšek	60,0%	40,0%	100,0%	
	% within klin lísk ořech	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	60,0%	40,0%	100,0%	

Bříza * klinicky lískový ořech

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití lískového ořechu a pozitivitou sIgE proti alergenu břízy Bet v 1. Sensitivita testu je 75%, specificita testu je 58,3%, korelační koeficient není signifikantní.

			klin lísk ořech		Total
			,00	1,00	
Bříza	,00	Count	14	4	18
		% within Bříza	77,8%	22,2%	100,0%
		% within klin lísk ořech	58,3%	25,0%	45,0%
		% of Total	35,0%	10,0%	45,0%
	2,00	Count	4	7	11
		% within Bříza	36,4%	63,6%	100,0%
		% within klin lísk ořech	16,7%	43,8%	27,5%
		% of Total	10,0%	17,5%	27,5%
	3,00	Count	6	5	11
		% within Bříza	54,5%	45,5%	100,0%
		% within klin lísk ořech	25,0%	31,3%	27,5%
		% of Total	15,0%	12,5%	27,5%
Total		Count	24	16	40
		% within Bříza	60,0%	40,0%	100,0%
		% within klin lísk ořech	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	60,0%	40,0%	100,0%

Olše * klinicky lískový ořech

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití lískového ořechu a pozitivitou sIgE proti alergenu olše Aln g 1. Sensitivita testu je 50%, specificita testu je 66,6%, korelační koeficient není signifikantní.

			klin lísk ořech		Total
			,00	1,00	
Olše	,00	Count	16	8	24
		% within Olše	66,7%	33,3%	100,0%
		% within klin lísk ořech	66,7%	50,0%	60,0%
		% of Total	40,0%	20,0%	60,0%
	2,00	Count	3	7	10
		% within Olše	30,0%	70,0%	100,0%
		% within klin lísk ořech	12,5%	43,8%	25,0%
		% of Total	7,5%	17,5%	25,0%
	3,00	Count	5	1	6
		% within Olše	83,3%	16,7%	100,0%
		% within klin lísk ořech	20,8%	6,3%	15,0%
		% of Total	12,5%	2,5%	15,0%
Total		Count	24	16	40
		% within Olše	60,0%	40,0%	100,0%
		% within klin lísk ořech	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	60,0%	40,0%	100,0%

Bříza * klinicky jablko

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití jablka a pozitivitou sIgE proti alergenu břízy Bet v 1. Sensitivita testu je 78,9%, specifická testu je 66,6%, korelační koeficient je signifikantní.

			klin jablko		Total
			,00	1,00	
Bříza	,00	Count	14	4	18
		% within Bříza	77,8%	22,2%	100,0%
		% within klin jablko	66,7%	21,1%	45,0%
		% of Total	35,0%	10,0%	45,0%
	2,00	Count	6	5	11
		% within Bříza	54,5%	45,5%	100,0%
		% within klin jablko	28,6%	26,3%	27,5%
		% of Total	15,0%	12,5%	27,5%
	3,00	Count	1	10	11
		% within Bříza	9,1%	90,9%	100,0%
		% within klin jablko	4,8%	52,6%	27,5%
		% of Total	2,5%	25,0%	27,5%
Total	Count		21	19	40
	% within Bříza		52,5%	47,5%	100,0%
	% within klin jablko		100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		52,5%	47,5%	100,0%

Lísk. oříšek * klinicky jablko

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití jablka a pozitivitou sIgE proti alergenu lískového ořechu Cor a 1.04. Sensitivita testu je 78,9%, specifická testu je 76,2%, korelační koeficient je signifikantní.

			klin jablko		Total
			,00	1,00	
Lísk. oříšek	,00	Count	16	4	20
		% within Lísk. oříšek	80,0%	20,0%	100,0%
		% within klin jablko	76,2%	21,1%	50,0%
		% of Total	40,0%	10,0%	50,0%
	1,00	Count	1	1	2
		% within Lísk. oříšek	50,0%	50,0%	100,0%
		% within klin jablko	4,8%	5,3%	5,0%
		% of Total	2,5%	2,5%	5,0%
	2,00	Count	3	12	15
		% within Lísk. oříšek	20,0%	80,0%	100,0%
		% within klin jablko	14,3%	63,2%	37,5%
		% of Total	7,5%	30,0%	37,5%
	3,00	Count	1	2	3
		% within Lísk. oříšek	33,3%	66,7%	100,0%
		% within klin jablko	4,8%	10,5%	7,5%
		% of Total	2,5%	5,0%	7,5%
Total	Count		21	19	40
	% within Lísk. oříšek		52,5%	47,5%	100,0%
	% within klin jablko		100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		52,5%	47,5%	100,0%

Olše * klinicky jablko

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití jablka a pozitivitou sIgE proti alergenu olše Aln g 1. Sensitivita testu je 68,4%, specificita testu je 85,7%, korelační koeficient je signifikantní.

			klin jablko		Total
			,00	1,00	
Olše	,00	Count	18	6	24
		% within Olše	75,0%	25,0%	100,0%
		% within klin jablko	85,7%	31,6%	60,0%
		% of Total	45,0%	15,0%	60,0%
	2,00	Count	2	8	10
		% within Olše	20,0%	80,0%	100,0%
		% within klin jablko	9,5%	42,1%	25,0%
		% of Total	5,0%	20,0%	25,0%
	3,00	Count	1	5	6
		% within Olše	16,7%	83,3%	100,0%
		% within klin jablko	4,8%	26,3%	15,0%
		% of Total	2,5%	12,5%	15,0%
Total		Count	21	19	40
		% within Olše	52,5%	47,5%	100,0%
		% within klin jablko	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	52,5%	47,5%	100,0%

Jablko * klinicky jablko

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití jablka a pozitivitou sIgE proti alergenu jablka Mal d 1. Sensitivita testu je 78,9%, specificita testu je 76,2%, korelační koeficient je signifikantní.

			klin jablko		Total
			,00	1,00	
Jablko	,00	Count	16	4	20
		% within Jablko	80,0%	20,0%	100,0%
		% within klin jablko	76,2%	21,1%	50,0%
		% of Total	40,0%	10,0%	50,0%
	1,00	Count	2	1	3
		% within Jablko	66,7%	33,3%	100,0%
		% within klin jablko	9,5%	5,3%	7,5%
		% of Total	5,0%	2,5%	7,5%
	2,00	Count	2	10	12
		% within Jablko	16,7%	83,3%	100,0%
		% within klin jablko	9,5%	52,6%	30,0%
		% of Total	5,0%	25,0%	30,0%
	3,00	Count	1	4	5
		% within Jablko	20,0%	80,0%	100,0%
		% within klin jablko	4,8%	21,1%	12,5%
		% of Total	2,5%	10,0%	12,5%
Total		Count	21	19	40
		% within Jablko	52,5%	47,5%	100,0%
		% within klin jablko	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	52,5%	47,5%	100,0%

Bříza * klinicky broskev

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití broskve a pozitivitou sIgE proti alergenu břízy Bet v 1. Sensitivita testu je 71,4%, specificita testu je 48,5%, korelační koeficient není signifikantní.

			klin broskev		Total
			,00	1,00	
Bříza	,00	Count	16	2	18
		% within Bříza	88,9%	11,1%	100,0%
		% within klin broskev	48,5%	28,6%	45,0%
		% of Total	40,0%	5,0%	45,0%
	2,00	Count	9	2	11
		% within Bříza	81,8%	18,2%	100,0%
		% within klin broskev	27,3%	28,6%	27,5%
		% of Total	22,5%	5,0%	27,5%
	3,00	Count	8	3	11
		% within Bříza	72,7%	27,3%	100,0%
		% within klin broskev	24,2%	42,9%	27,5%
		% of Total	20,0%	7,5%	27,5%
Total	Count		33	7	40
	% within Bříza		82,5%	17,5%	100,0%
	% within klin broskev		100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		82,5%	17,5%	100,0%

Lísk. oříšek * klinicky broskev

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití broskve a pozitivitou sIgE proti alergenu lískového oříšku Cor a 1.04. Sensitivita testu je 71,4%, specificita testu je 54,5%, korelační koeficient není signifikantní.

			klin broskev		Total
			,00	1,00	
Lísk. oříšek	,00	Count	18	2	20
		% within Lísk. oříšek	90,0%	10,0%	100,0%
		% within klin broskev	54,5%	28,6%	50,0%
		% of Total	45,0%	5,0%	50,0%
	1,00	Count	2	0	2
		% within Lísk. oříšek	100,0%	,0%	100,0%
		% within klin broskev	6,1%	,0%	5,0%
		% of Total	5,0%	,0%	5,0%
	2,00	Count	10	5	15
		% within Lísk. oříšek	66,7%	33,3%	100,0%
		% within klin broskev	30,3%	71,4%	37,5%
		% of Total	25,0%	12,5%	37,5%
	3,00	Count	3	0	3
		% within Lísk. oříšek	100,0%	,0%	100,0%
		% within klin broskev	9,1%	,0%	7,5%
		% of Total	7,5%	,0%	7,5%
Total	Count		33	7	40
	% within Lísk. oříšek		82,5%	17,5%	100,0%
	% within klin broskev		100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		82,5%	17,5%	100,0%

Olše * klinicky broskev

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití broskve a pozitivitou sIgE proti alergenu olše Aln g 1. Sensitivita testu je 57,1%, specificita testu je 63,6%, korelační koeficient není signifikantní.

			klin broskev		Total
			,00	1,00	
Olše	,00	Count	21	3	24
		% within Olše	87,5%	12,5%	100,0%
		% within klin broskev	63,6%	42,9%	60,0%
		% of Total	52,5%	7,5%	60,0%
	2,00	Count	8	2	10
		% within Olše	80,0%	20,0%	100,0%
		% within klin broskev	24,2%	28,6%	25,0%
		% of Total	20,0%	5,0%	25,0%
	3,00	Count	4	2	6
		% within Olše	66,7%	33,3%	100,0%
		% within klin broskev	12,1%	28,6%	15,0%
		% of Total	10,0%	5,0%	15,0%
	Total		33	7	40
			82,5%	17,5%	100,0%
			100,0%	100,0%	100,0%
			82,5%	17,5%	100,0%

Broskev * klin broskev

Tabulka vyjadřuje vztah mezi klinickými projevy po požití broskve a pozitivitou sIgE proti alergenu broskve Pru p 1. Sensitivita testu je 57,1%, specificita testu je 54,54%, korelační koeficient je nevýznamný.

			klin broskev		Total
			,00	1,00	
Broskev	,00	Count	18	3	21
		% within Broskev	85,7%	14,3%	100,0%
		% within klin broskev	54,5%	42,9%	52,5%
		% of Total	45,0%	7,5%	52,5%
	2,00	Count	12	4	16
		% within Broskev	75,0%	25,0%	100,0%
		% within klin broskev	36,4%	57,1%	40,0%
		% of Total	30,0%	10,0%	40,0%
	3,00	Count	3	0	3
		% within Broskev	100,0%	,0%	100,0%
		% within klin broskev	9,1%	,0%	7,5%
		% of Total	7,5%	,0%	7,5%
	Total		33	7	40
			82,5%	17,5%	100,0%
			100,0%	100,0%	100,0%
			82,5%	17,5%	100,0%

5.2.2 Vyhodnocení

Na základě laboratorního vyšetření sIgE bylo zjištěno, že u 9 pacientů, tj. 22,5% souboru, je sIgE proti všem testovaným alergenům negativní. Naproti tomu nejvyšší četnost výskytu vykazovala pozitivní zkřížená reaktivita na podkladě PR-10 proteinu, a to u 22 pacientů, tj. 55% souboru. Z hlediska pylově-potravinového syndromu je PR-10 protein významným spouštěčem.

Nejčtenější pozitivita sIgE v našem souboru byla laboratorně potvrzena u alergenu břízy Bet v 1, a to u 22 pacientů, tj. 55 % souboru. Z toho 15 pacientů, tedy 68 % pacientů s pozitivním sIgE proti Bet v 1, má klinické projevy OAS po požití jablka. Pouze 7 pacientů, tj. 17,5% souboru, má klinické potíže po požití jablka a nemá pozitivní sIgE proti Bet v 1.

Ze statistického zpracování této práce vyplývá, že vztah mezi pozitivitou sIgE proti Bet v 1 a klinickými projevy po jablku je skutečně signifikantní, na základě hodnoty Spearmannova korelačního koeficientu. Pravděpodobnost náhodnosti tohoto vztahu, vyplývající z hodnoty p odpovídající hodnotě Chí-kvadrátu, je méně než 0,2%. Podobný vztah jako Bet v 1 má ke klinickým projevům po požití jablka alergen olše Aln g 1. Nejvyšší specifitu ve vztahu ke klinickým projevům po jablku má vlastní alergen jablka Mal d 1.

Vedle alergenu jablka laboratorně vykazoval zkříženou reaktivitu s Bet v 1 alergen lískového ořechu Cor a 1.04. Z laboratorních výsledků a klinické anamnézy vyplývá, že 54,5% (tj. 12 pacientů) s pozitivním sIgE proti Bet v 1 má klinické obtíže po požití lískového ořechu. Pouze 4 pacienti, tj. 10% souboru, má klinické projevy po lískovém ořechu, ale nemá pozitivní sIgE proti Bet v 1. Pravděpodobnost náhody mezi pozitivním sIgE proti Bet v 1 nebo Aln g1 a rozvojem klinických projevů po lískovém ořechu se pohybuje okolo 7% a menší vzájemnou vazbu v tomto vztahu potvrzují i hodnoty Spearmannova korelačního koeficientu. Ani vztah klinických projevů po lískovém ořechu a pozitivního sIgE proti vlastnímu alergenu Cor a 1.04 není významně přínosný pro diagnostiku z pohledu možné předpovědi klinických projevů ve vztahu k pozitivnímu sIgE.

Pouze 22,7 % (tj. 5 pacientů) s pozitivním sIgE proti Bet v 1 má klinické příznaky po požití broskve. Ve vztahu mezi pozitivitou sIgE proti Bet v 1, Aln g 1, Cor a 1.04 a Pru 1 je více než 50% pravděpodobnost, že vztah je náhodný. V tomto případě se setkáváme s velkým množstvím falešně pozitivních výsledků,

kdy 18 pacientů má pozitivní sIgE proti Pru p 1 a zároveň Bet v 1, ale nevykazují pozitivní klinické projevy po požití broskve. Vysoký počet falešně pozitivních výsledků je vysvětlován právě zkříženou reaktivitou.

Lískový ořech - klinický projev

<i>Pozitivní sIgE</i>	<i>Pearson Chi-kvadrát</i>		<i>Spearmanův korelační koeficient</i>	
<i>Bříza</i>	X^2 (2): 5,067	p= 0,0079	r= 0,252	p= 0,117
<i>Olše</i>	X^2 (2): 7,708	p= 0,062	r= 0,081	p= 0,620
<i>Lísk.ořech</i>	X^2 (3): 7,708	p= 0,052	r= 0,310	p= 0,052

Jablko - klinický projev

<i>Pozitivní sIgE</i>	<i>Pearson Chi-kvadrát</i>		<i>Spearmanův korelační koeficient</i>	
<i>Bříza</i>	X^2 (2): 12,942	p= 0,002	r= 0,552	p=0
<i>Olše</i>	X^2 (2) : 12,197	p= 0,002	r= 0,540	p=0
<i>Lísk.ořech</i>	X^2 (3) : 12,865	p= 0,005	r= 0,536	p=0
<i>Jablko</i>	X^2 (3) : 14,603	p=0,002	r= 0,573	p=0

Broskev - klinický projev

<i>Pozitivní sIgE</i>	<i>Pearson Chi-kvadrát</i>		<i>Spearmanův korelační koeficient</i>	
<i>Bříza</i>	X^2 (2): 1,240	p= 0,538	r= 0,174	p= 0,282
<i>Olše</i>	X^2 (2): 1,501	p= 0,472	r= 0,182	p= 0,260
<i>Lísk.ořech</i>	X^2 (3): 4,444	p= 0,217	r= 0,173	p= 0,286
<i>Broskev</i>	X^2 (2): 1,410	p= 0,494	r= 0,048	p= 0,768

Pozn.: Rozdělení do kategorií 0-3 podle stupně positivity sIgE

0	< 0,3	nedetekovatelné
1	0,3 - 0,9	nízká
2	1 – 14,9	mírně vysoká
3	≥ 15	velmi vysoká

Rozdělení do kategorií 0-1 na základě positivity klinických příznaků

0	NE	(nepřítomna) pozitivní vazba na subjektivně udávané alergen
1	ANO	(přítomna) pozitivní vazba na subjektivně udávané alergen

6. DISKUZE

Nejvyšší četnost výskytu vykazovala pozitivní zkřížená reaktivita na podkladě PR-10 proteinu, který je z hlediska pylově-potravinového syndromu nejvýznamnější a v mírných pásech Evropy patří mezi hlavní spouštěče pylové alergie. [10] Mezi nejvýznamnější alergenů této skupiny patří hlavní alergen břízy Bet v 1, hlavní alergen jablka Mal d 1, alergen broskve Pru p 1, třešně Pru av 1, dále alergen olše Aln g 1 a kiwi Act d 8.

OAS je v dospělé populaci nejčastějším projevem potravinové alergie [14]. Podle provedených studií 47-70% pacientů s pylovou alergií mělo po požití ovoce nebo zeleniny příznaky OAS [15-17].

Z výsledků práce vyplývá, že nejvýznamnější, z hodnocených vztahů, je vztah výskytu klinických projevů OAS po jablku a pozitivního sIgE proti Mal d 1 a Bet v 1. Hlavní alergen jablka Mal d 1 vykazuje 64% homologii s alergenem Bet v 1. Avšak ne vždy je shoda mezi pozitivním sIgE v séru a výskytem klinických projevů, přestože se sIgE proti Bet v 1 většiny pacientů s touto alergií váže na Mal d 1. Bylo prokázáno, že je to v důsledku vazby sIgE na jiné aminokyselinové sekvence uvnitř struktury alergenu Bet v 1. [18] Při pozitivitě sIgE proti Bet v 1 a Mal d 1 lze předpokládat výskyt klinických projevů po jablku s více než 55% pravděpodobností.

Naopak výsledky vztahu mezi klinickými projevy OAS po broskvi a pozitivitou sIgE proti Bet v 1 je s více než 53% pravděpodobností náhodný. Zajímavé je, že korelace ve vztahu klinických projevů OAS po broskvi k pozitivitě sIgE proti vlastnímu alergenů broskve Pru p 1 je necelých 5%. V tomto případě došlo ke vzniku falešně pozitivních výsledků, jejichž příčinou je paradoxně zkřížená reaktivita, která je podstatou OAS.

7. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byl laboratorně vyšetřen soubor 40 pacientů na pozitivitu sIgE metodou ISAC. Výsledky měření byly hodnoceny ve vztahu k pozitivním klinickým projevům, uváděným pacienty, s cílem stanovit vztah mezi pozitivitou sIgE a pravděpodobností výskytu klinických projevů. Zhodnocení výsledků je zaměřeno na projevy OAS s pylovou asociací Bet v 1 a Aln g 1. Statisticky nejvýznamnější je vztah mezi Bet v 1 a projevů OAS po jablku. Na základě výsledků bylo stanoveno, že pravděpodobnost náhodného výskytu projevů OAS po jablku s pozitivitou sIgE proti Bet v 1 je méně než 0,2%. Vzájemná vazba byla potvrzena, což koreluje s dostupnými zdroji. Při testování sIgE a projevů OAS po broskvi bylo detekováno množství falešně pozitivních výsledků sIgE proti Pru p 1.

Využití mikročipových technologií a rekombinantních alergenů nám umožňuje rychlou a přesnou diagnostiku, která nám pomáhá sestavit komplexní profil senzibilizace pacienta. Technologie microarray poskytuje široký screening sIgE proti rozsáhlému spektru alergenových složek, ale nedokáže rozlišit klinicky významnou pozitivitu sIgE od klinicky nevýznamné. Z tohoto důvodu je vždy nezbytná vazba výsledků měření na pacientovu anamnézu.

8. LITERATURA

1. Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Macha V.: Imunitní systém. 1.vyd. české, Grada Praha, **2005**, 236 s.
2. Eigenmann P, Sicherer S, Borowski T, *et al.*: Prevalence of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis. *Pediatrics* **1998**; 101:e8.
3. Burks AW, James JM, Hiegel A, *et al.*: Atopic dermatitis and food hypersensitivity reactions. *J Pediatr* **1998**; 132:132–136.
4. Špičák V., Panzner P., hlavní autoři a pořadatelé: Alergologie. 1.vyd., Galén-Karolinum, **2004**, 348 s.
5. Sanz M., Blázquez A., García B.: Microarray of allergenic component-based diagnosis in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2011**; 11:204–209, © 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams&Wilkins
Dostupné na: <http://www.co-allergy.cz/pdf?id=37385>
6. Petřů V. a kolektiv: Dětská alergologie. 1.vyd., Mladá fronta Praha, **2012**, 532s.
7. Krejsek J., Kopecký O.: Klinická imunologie. 1.vyd., Nukleus Hradec Králové, **2004**, 941 s.
8. Lincová Dagmar, Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie (kapitola 17.2 Imunofarmakologie), 2.vyd., Galén, **2010**, 672 s.
9. Beyer K., Teuber S.: Food allergy diagnostics: scientific and unproven procedures. *Curr Opin in Allergy Clin Immunol* **2005**, 5:261-266, © 2005 Lippincott Williams & Wilkins, Inc.
Dostupné na: <http://www.co-allergy.cz/pdf?id=1769>
10. Katelaris C. H.: Food allergy and oral allergy OR pollen-food syndrome. *Curr Opin in Allergy Clin Immunol* **2010**, 10:246-251, © 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams&Wilkins
Dostupné na: <http://www.co-allergy.cz/pdf?id=32683>
11. Hofmann A., Burks W.: Pollen food syndrome: update on the allergens. *Curr Allergy & Asthma Reports* **2008**; 8:413–417.
12. Harwanegg C.: ImmunoCAP® ISAC Technology Presentation, Phadia 2009
13. Vlas T.: SOPV ISAC – FN Plzeň, 2010

14. Fernandez-Rivas M, Benito C, Gonzalez-Mancebo E, *et al.*: Allergies to fruits and vegetables. *Pediatr Allergy Immunol* **2008**; 19:675–681.
15. Anderson LB, Dreyfuss EM, Logan J, *et al.*: Melon and banana sensitivity coincident with ragweed pollinosis. *J Allergy* 1970; 45:3120–3319.
16. Dreborg S, Foucard T.: Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* 1983; 38:167–172. 30:1411–1416.
17. Cuesta-Herranz J, Lazaro M, Figueredo E, *et al.*: Allergy to plant-derived fresh foods in a birch-and ragweed-free area. *Clin Exp Allergy* **2000**
18. Klinglmayer E, Hauser M, Zimmermann F, *et al.* Identification of B-cell epitopes of Bet v 1 involved in cross-reactivity with food allergens. *Allergy* **2009**; 64:647–651.
19. Honzová S.: Možnosti laboratorní diagnostiky alergie. *Interní medicína pro praxi* 2009; 11(4), www.internimedicina.cz
20. Bystroň J.: Alergie: Průvodce alergickými nemocemi pro lékaře i pacienty. 1.vyd., Morava Ostrava, **1997**, 228 s.
21. Arshad S.H.: Allergy (An illustrated colour text). 1.vyd., Churchill Livingstone, **2002**, 107 s.
Dostupné na: <http://www.co-allergy.cz/pdf?id=37385>
22. Burks W., Helm R., Stanley S. and Bannon G.: Food allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2001**, , © 2001 Lippincott Williams&Wilkins 1528-4050
23. Moneret-Vautrin, Denise Anne: Cross reactivity of food allergens and its clinical relevance. *Bulletin de l Academie Nationale de Medecine*. 189(7):1491-501; discussion 1501-2, **2005**, MEDLINE, a database of the U.S. National Library of Medicine.

SEZNAM ZKRATEK

CSF	colony stimulating factor
GIT	gastrointestinální trakt
ISU	ISAC Standarized Units
MIA	Microarray Image Anylysis Software
OAS	orální alergický syndrom
PAF	plateled-activating factor – faktor aktivující trombocyty
sIgE	specifický Imunoglobulin E
ÚKIA FNHK	Ústav klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové